

Title	リボヌクレアーゼHIIの構造と機能の解析
Author(s)	室谷, 歩
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/43398
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	室谷歩
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第16980号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科物質・生命工学専攻
学位論文名	リボヌクレアーゼ HII の構造と機能の解析
論文審査委員	(主査) 教授 金谷 茂則
	(副査) 教授 卜部 格 教授 宮田 幹二 教授 福住 俊一 教授 柳田 祥三 教授 横山 正明 教授 高井 義造 教授 伊東 一良 教授 梅野 正隆

論文内容の要旨

この論文は超好熱菌と好熱菌の RNase HII を対象として行った構造と機能についての研究の結果をまとめたものである。第1章では超好熱菌 *T. kodakaraensis* KOD1株から RNase HII をコードする遺伝子をクローニングした。その遺伝子を大量発現させ、酵素 (Tk-RNase HII) の諸特性を解析した。第2章では、前章で単離した遺伝子を発現させて、Tk-RNase HII の結晶化を試みた。それと同時に原子レベルの分解能における構造解析を行うにふさわしい結晶を得るために、C末端が欠失した各種変異体を構築した。最も高分解能を与える結晶について、X線回折強度データを収集し、重原子誘導体結晶のデータと合わせて位相計算を行った。それによって得られた電子密度図上に原子モデルを作成し、さらに、これを精密化し、最終モデルを得た。*E. coli* RNase HI の三次構造との比較から、Tk-RNase HII の活性部位を特定した。これを形成するアミノ酸残基の変異体の生化学的な解析を行うことにより、これらのアミノ酸が触媒反応に重要な残基であることを確認した。また、各種C末端欠失変異体の基質結合能を調べることにより、C末端の $\alpha 9$ helix が基質との結合に関与していることを明らかにした。第3章では *B. stearothermophilus* から RNase HII をコードする遺伝子をクローニングした。この酵素 (Bst-RNase HII) が有している約70残基からなるN末端の延長部分は Tk-RNase HII に存在しない。この部分を欠失した変異体は活性を示さず、基質との結合能も有していなかった。このN末端の領域を除いた、他の RNase HII との相同性の高い部分の構造について、前章で得られた Tk-RNase HII の結晶構造をもとにホモロジーモデリングを行った。それによると、Bst-RNase HII の活性部位の構造は Tk-RNase HII のものと一致するが、基質結合部位と考えられるN末端の延長部分の構造は、Tk-RNase HII のどの部分の構造とも一致しないことがわかった。総括として分子進化論的な立場から本研究の意義付けを行っている。

論文審査の結果の要旨

本研究は、RNase HII の三次構造を明らかにし、酵素学的な解析を行うことを目的として行われた結果、以下に示す知見を得ている。第一章では、Tk-RNase HII が高い熱安定性と幅広い金属イオン特異性を有しながら、*E. coli* RNase HI とよく似た活性を示すことを明らかにしている。第二章では、結晶化及びX線解析により、三次構造を決

定し、各種変異体を用いた生化学的な解析から活性中心と基質結合部位を同定している。第三章では、*Bacillus* 属 RNase HII の生化学的な解析を行うことにより基質結合部位を特定し、超好熱菌 RNase HII のものとは全く異なることを示している。

以上のように、本論文は RNase HII の構造と機能の相関を理解し、本酵素の産業的利用を図る上で有益な知見を与えるものであり、本論文は博士論文として価値あるものと認める。